



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 : A61K 9/50, 9/51, 9/54 A61K 47/42, 47/48		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/21330 (43) Date de publication internationale: 10 décembre 1992 (10.12.92)		
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00506		(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).			
(22) Date de dépôt international: 5 juin 1992 (05.06.92)					
(30) Données relatives à la priorité: 91/06812 5 juin 1991 (05.06.91) FR					
(71) Déposants (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): A ET S BIOVECTEURS [FR/FR]; Parc du Canal, 10, avenue de l'Europe, F-31520 Ramonville-Saint-Agne (FR). CENTRE CLAUDIUS REGAUD [FR/FR]; 20-24, rue de Pont-Saint-Pierre, F-31520 Toulouse (FR).		(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, KR, LU (brevet européen), MC (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.			
(72) Inventeurs; et		Publiée			
(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): SAMAIN, Daniel [FR/FR]; 100, chemin de Pechbusque, F-31400 Toulouse (FR). FAVRE, Gilles [FR/FR]; 19, rue Laganne, F-31000 Toulouse (FR). NGUYEN, Frédérique [FR/FR]; 12, chemin de Chauchamp, F-17640 Vaux-sur-Mer (FR). PEYROT, Marianne [FR/FR]; Cessac, F-46140 Douelle (FR). MERCIER, Philippe [FR/FR]; 46, avenue Léon-Blum, F-31000 Toulouse (FR). SOULET, Nadine [FR/FR]; 18, rue J.-Rouvière, F-31100 Toulouse (FR). DIRSON, Roselyne [FR/FR]; 7, rue S.-Thomas-d'Aquin, F-31400 Toulouse (FR). CAZES, Sylvie [FR/FR]; Résidence le Gué de Noncesse, 33, rue René-Averseng, F-31130 Balmes (FR). DE MIGUEL, Ignacio [ES/FR]; 28, rue Henri-de-Sahuque, F-31400 Toulouse (FR). MENIALI, Jaouad [MA/FR]; 134, chemin de la Salade-Ponsan, F-31400 Toulouse (FR).		Avec rapport de recherche internationale.			
(54) Title: PARTICULATE VECTOR HAVING SELECTIVE TROPISM, METHOD OF PREPARATION AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION					
(54) Titre: VECTEUR PARTICULAIRE A TROPISME SELECTIF, PROCEDE DE PREPARATION ET COMPOSITION PHARMACEUTIQUE					
(57) Abstract					
A synthetic particulate vector is disclosed and is characterized in that it has selective tropism for a type of cell and that it comprises: a non liquid hydrophilic nucleus, a first layer or crown of a lipid nature linked to the nucleus by covalent bonds, a second layer or external film of phospholipids linked to the first layer by hydrophobic interactions, B apolipoprotein molecules attached to the phospholipid layer. A method of preparing said vector and a pharmaceutical composition containing it are also disclosed.					
(57) Abrégé					
La présente invention concerne un vecteur particulaire synthétique, caractérisé en ce qu'il possède un tropisme sélectif pour un type de cellules et en ce qu'il comporte: un noyau hydrophile non liquide; une première couche ou couronne de nature lipidique liée au noyau par des liaisons covalentes; une seconde couche ou feuillet externe de phospholipides liée à la première couche par des interactions hydrophobes; des molécules d'apolipoprotéine B greffées sur la couche de phospholipides. Elle concerne également un procédé de préparation d'un tel vecteur, ainsi qu'une composition pharmaceutique le contenant.					

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FI	Finlande	ML	Mali
AU	Australie	FR	France	MN	Mongolie
BB	Barbade	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	CN	Guinée	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NO	Norvège
BJ	Bénin	HU	Hongrie	PL	Pologne
BR	Brésil	IE	Irlande	RO	Roumanie
CA	Canada	IT	Italie	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TC	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MG	Madagascar		
ES	Espagne				

VECTEUR PARTICULAIRE A TROPISME SELECTIF, PROCEDE DE PREPARATION ET COMPOSITION PHARMACEUTIQUE

La présente invention se rapporte à un vecteur particulaire synthétique possédant une structure biomimétique calquée sur celle des lipoprotéines de basse densité (Low Density Lipoproteins ou LDL). Ce type de vecteur possède trois propriétés fondamentales :

- 5 1) c'est un système de délivrance intracellulaire de principe actif
- 2) il possède une capacité de ciblage de certains types de cellules en particulier des cellules tumorales ou des macrophages
- 3) c'est un système de vectorisation particulière systémique capable de diffuser dans tout l'organisme.

10 Lors de l'administration systémique d'un médicament, la proportion atteignant effectivement la cible est souvent faible. Ceci est dû à la conjugaison de plusieurs facteurs :

- 1) les produits administrés ont fréquemment une stabilité limitée dans l'organisme et notamment dans la circulation sanguine. Ils sont donc dégradés ou complexés par des protéines avant d'atteindre leur cible et perdus pour l'effet thérapeutique souhaité.
- 15 2) ils ne sont pas toujours capables de franchir efficacement les membranes cellulaires. Ceci présente un inconvénient majeur dans le cas où le site d'action visé est situé à l'intérieur de la cellule puisqu'il va falloir maintenir une concentration plasmatique très élevée et sur une longue période pour pouvoir atteindre une concentration intracellulaire efficace.
- 20 3) la spécificité d'action de la molécule est généralement faible. Ceci se traduit à nouveau par la nécessité d'administrer de fortes doses de médicaments afin qu'une quantité suffisante atteigne le site d'action recherché pour l'activité thérapeutique. Il en résulte une activité en une multiplicité de sites de l'organisme et l'apparition d'effets secondaires indésirables.

25 C'est pourquoi il est particulièrement intéressant de disposer d'un moyen de protéger le médicament après son administration dans

l'organisme et de lui permettre d'exercer son action à l'intérieur des cellules sur lesquelles on désire que la molécule agisse. Il serait ainsi possible d'augmenter de façon significative l'efficacité de molécules biologiquement actives à propriétés pharmacologiques, notamment de 5 médicaments antiparasitaires, antimicrobiens, antiviraux ou anticancéreux.

Ciblages des cellules cancéreuses par des médicaments cytotoxiques

L'utilisation en clinique humaine de médicaments cytotoxiques 10 est en effet limitée par leur incapacité à distinguer les cellules normales des cellules tumorales. Cette incapacité et leur importante toxicité représentent un problème majeur du traitement des affections cancéreuses. Ainsi tout moyen permettant d'augmenter la fraction de principes actifs atteignant la masse tumorale est du plus grand intérêt. Parmi ces moyens, 15 on peut évoquer l'incorporation de médicaments cytostatiques dans des macromolécules servant de "transporteurs" et choisies pour leur capacité de ciblage des cellules tumorales.

Malgré quelques résultats partiels encourageants, aucun de ces vecteurs ne semble, à ce jour, avoir fait la preuve d'une réelle efficacité en 20 clinique humaine, et de nombreux problèmes restent à résoudre, notamment :

- le piégeage des transporteurs par le système réticulo-endo-thélial (SRE)
- le relargage du principe actif au niveau de la cible
- les réactions immunitaires vis-à-vis du vecteur

Ciblage des macrophages par des médicaments antiparasitaires, antimicrobiens ou antiviraux

Il existe de nombreuses affections dans lesquelles l'agent pathogène se multiplie ou survit à l'état latent de façon intracellulaire 30

5 dans les macrophages. Le rôle de ces derniers est normalement de phagocytter ces agents pathogènes et de les détruire. Cependant un certain nombre des microorganismes a évolué de façon à échapper aux systèmes lytiques des macrophages : sécrétion d'inhibiteurs d'enzymes lytiques, inhibiteurs de radicaux libres, inhibition des enzymes lytiques par altération du pH intracellulaire, biosynthèse d'enveloppes résistantes aux enzymes, etc... La localisation intracellulaire de ces microorganismes leur permet d'éviter d'être neutralisés par les anticorps circulants et d'être protégés de l'action des médicaments ne diffusant pas dans le milieu 10 cellulaire. L'éradication de ces affections intracellulaires est donc très difficile avec des traitements très longs, peu efficaces et de nombreux cas de rechute.

15 Délivrance intracellulaire de molécules biologiquement actives

Il existe un certain nombre de molécules qui possèdent une très grande spécificité d'action mais dont l'utilisation en tant que médicament est limitée soit par leur instabilité dans le milieu plasmatique soit par leur incapacité à diffuser dans le milieu cellulaire.

20 L'intérêt potentiel thérapeutique de ces molécules et leur spécificité d'action est facilement démontré et mis en évidence sur des modèles in vitro. Malheureusement cet intérêt n'est pas confirmé in vivo par suite des difficultés que nous avons évoquées précédemment. Il existe de très nombreux produits appartenant à cette catégorie, notamment des peptides, des protéines et des oligonucléotides.

25 Parmi les candidats les plus intéressants capables d'assurer l'ensemble de ces fonctions de transports, de délivrance et de ciblage, les lipoprotéines de basse densité (Low Density Lipoproteins ou LDL) se distinguent par une série de propriétés remarquables.

30

Les LDL, principaux transporteurs du cholestérol plasmatique, sont les lipoprotéines les plus sollicitées dans l'apport de cholestérol exogène aux cellules. Celles-ci, constituées d'un noyau apolaire de triglycérides et d'esters de cholestérol, comportent en périphérie une monocouche de phospholipides, de cholestérol libre et d'apolipoprotéine B. Par leur taille de 20nm, celles-ci sont capables de diffuser de façon systémique dans tout l'organisme pour atteindre chaque cellule individuellement.

Les cellules incorporent les LDL en particulier par un mécanisme qui met en cause un récepteur membranaire spécifique de haute affinité. Après fixation au récepteur, plusieurs mécanismes autorégulés par la cellule aboutissent à une dégradation par des enzymes lysosomales des LDL ainsi internalisées, ce qui a pour effet de libérer le cholestérol directement utilisable pour la cellule.

L'utilisation de ce système de transport permet donc, à condition bien sûr de pouvoir incorporer des quantités suffisantes de médicament à l'intérieur des LDL, d'assurer une protection des principes actifs dans le milieu plasmatique et leur délivrance à l'intérieur du milieu cellulaire.

Par ailleurs, bien que pratiquement toutes les cellules expriment des récepteurs aux LDL, il existe des différentiels d'expression qu'il est possible d'utiliser et même dans certains cas de magnifier pour parvenir à assurer un ciblage par captation ou par décharge préférentielles. Les différentiels d'expression intéressants peuvent être négatifs ou positifs.

Par exemple, on peut citer le tissu cardiaque et le tissu rénal qui présentent une faible expression de récepteurs aux LDL, ce qui est très intéressant étant donné la susceptibilité de ces tissus à de nombreux médicaments. Bien que les cellules du système nerveux central présentent des récepteurs aux LDL, celles-ci ne sont pas capables de franchir la barrière hémato-méningée. La vectorisation par les LDL permet donc d'obtenir une décharge de ces trois organes.

Parmi les tissus présentant un différentiel d'expression de récepteur aux LDL positif, on peut mentionner, au niveau physiologique, le tissu hépatique et, au niveau physiopathologique, le tissu tumoral.

Dans ce dernier cas, il a été démontré que les cellules tumorales grâce à leur activité proliférative et l'altération de leur système de régulation du cholestérol présentent à la surface de leur membrane un plus grand nombre de récepteurs aux LDL que les cellules saines correspondantes et captent de ce fait davantage de LDL (voir par exemple Biochimica Biophysica Acta 1003 (1989) 301-306).

Des travaux ont été publiés sur l'utilisation des LDL comme vecteur d'agents cytotoxiques. Différentes techniques d'incorporation ont été décrites, du simple contact lipoprotéine/principe actif cytotoxique au greffage covalent sur l'apoB. Les complexes ainsi obtenus conservent leur capacité d'être spécifiquement reconnus par le récepteur membranaire de haute affinité et présentent un métabolisme in vivo chez la souris identique à celui des LDL natives.

Par ailleurs les LDL subissent à la longue une oxydation qui modifie leur reconnaissance. Les LDL oxydées ne sont plus reconnues par le récepteur cellulaire à l'apolipoprotéine B100/E mais par contre sont reconnues spécifiquement par un autre récepteur situé sur les macrophages. Il est donc possible grâce aux LDL oxydées de cibler spécifiquement le macrophage. Les propriétés de phagocytes du macrophage font qu'il n'est pas très difficile de vectoriser un principe actif vers les macrophages du SRE puisque n'importe quelle particule administrée par voie intraveineuse sera reconnue comme étrangère à l'organisme et phagocytée très rapidement. Toutefois les particules doivent posséder une taille suffisamment importante (100nm) pour pouvoir être phagocytées efficacement et ces tailles sont incompatibles avec une bonne diffusion systémique.

L'utilisation de particules de diamètre supérieur à 100nm permet donc de cibler les macrophages du SRE qui sont facilement

accessibles mais pas les macrophages tissulaires. L'utilisation de LDL oxydées qui diffusent de manière systémique permet donc de cibler l'ensemble des macrophages.

5 L'utilisation de LDL natives présente cependant un certain nombre de limitations :

- le noyau des LDL est hautement apolaire et de ce fait il ne peut stocker que des médicaments eux-mêmes apolaires
- la capacité de stockage des noyaux est limitée par la nécessité de conserver leur intégrité structurale indispensable au métabolisme des LDL
- les LDL doivent être isolées du plasma humain et possèdent une conservation limitée

10 C'est pourquoi la présente invention se rapporte à un vecteur particulaire synthétique caractérisé en ce qu'il possèdent un tropisme 15 sélectif pour des types particuliers de cellules et une délivrance intracellulaire et en ce qu'il comporte :

- un noyau hydrophile non liquide
- une première couche ou couronne de nature lipidique liée au noyau par des liaisons covalentes
- une seconde couche ou feuillet externe de phospholipides liée à la première couche par des interactions hydrophobes
- des protéines ayant une affinité pour les récepteurs se trouvant sur la cellule à cibler, notamment des molécules d'apolipoprotéine B, greffées sur la couche de phospholipides.

20 25 Ce type de vecteur particulaire est capable d'encapsuler efficacement des principes actifs notamment des agents cytotoxiques de nature variée, tout en présentant les mêmes caractéristiques que les LDL, notamment leur taille et leur capacité à être reconnues et internalisées par les cellules et par exemple préférentiellement par les cellules tumorales.

30

35

Ces vecteurs sont construits à partir de particules de Bio Vecteurs Supra Moléculaires (BVSM) qui font l'objet des demandes de brevet EP 344 040 et FR 91 06743.

Ces BVSM ont une taille comprise entre 15 et 25nm.

5 Le noyau hydrophile non liquide sera essentiellement un polymère hydrophile, de préférence un polysaccharide biodégradable, choisi dans le groupe comprenant le dextrane, l'amidon et la cellulose et leurs dérivés.

10 Une première couche lipidique est liée au noyau polysaccharidique de 20nm de diamètre. Cette première couche est fixée par acylation régiosélective d'acides gras en périphérie des noyaux de polysaccharides réticulés.

15 La seconde couche ou feuillet externe est constituée de phospholipides identiques à ceux présents dans les LDL.

15 Le greffage de l'apolipoprotéine B est une étape délicate dans la synthèse de ces vecteurs. En effet l'apoB est une protéine hydrophobe et susceptible de s'agréger aisément par l'intermédiaire de ponts disulfures covalents. Cette agrégation est irréversible et dénature complètement la protéine qui n'est alors plus reconnue par le récepteur spécifique. Il faut donc isoler et greffer l'apoB dans des conditions très douces et non-dénaturantes. Nous avons choisi deux stratégies :

25 - isolement de l'apoB seule en présence de détergent : le détergent permet de solubiliser l'apoB en solution aqueuse dans des conditions non-dénaturantes et celle-ci est transférée des micelles de détergent sur les BVSM par dialyse du détergent

- isolement de l'apoB avec son environnement phospholipidique: l'apoB avec le feuillet phospholipidique des LDL, partiel ou complet, est greffée sur des BVSM plus ou moins riches en phospholipides

30 Ce type de vecteur peut servir au ciblage d'autres types de cellules moyennant de légères modifications.

En effet des modifications mineures de l'apoB changent le type de récepteur capable de reconnaître les LDL et le greffage de l'apoB modifiée à la surface de vecteurs permet de cibler spécifiquement d'autres types de cellules.

La présente invention concerne également un vecteur particulaire répondant à la définition ci-dessus et dans lequel les molécules d'apolipoprotéine B sont acétylées, oxydées et/ou ont subi tout type de modifications chimiques. Ce type de vecteur présente un tropisme sélectif pour les macrophages. Il trouvera une application particulièrement intéressante dans les affections impliquant ces cellules : infections virales, parasitoses, bactérioses intracellulaires.

La présente invention concerne un vecteur particulaire tel que défini précédemment et caractérisé en ce que le noyau hydrophile comporte en outre un principe actif.

En effet, pour ne pas perturber le mécanisme de reconnaissance cellulaire par une modification des propriétés de surface de la particule, les principes actifs sont chargés à l'intérieur du noyau polysaccharidique.

Selon le type de vecteur choisi, le principe actif sera dirigé vers un type de cellules plus particulièrement.

C'est ainsi que la présente invention concerne un vecteur particulaire tel que défini précédemment et caractérisé en ce que le principe actif est choisi de préférence dans le groupe comprenant des médicaments anticancéreux, réversants de résistance aux médicaments anticancéreux, immunomodulateurs, oligonucléotides, ARN messagers anti-sens, hépatoprotecteurs, inhibiteurs de HMGCoA réductase.

Selon l'un des aspects préférés de l'invention, le principe actif anticancéreux est un agent intercalant choisi dans le groupe des anthracyclines, et plus particulièrement parmi l'aclarubicine, l'épirubicine, la daunorubicine, la doxorubicine et la zorubicine.

Elle concerne également un vecteur particulaire tel que défini précédemment et caractérisé en ce que le principe actif est choisi dans le

groupe comprenant antiviraux, antibactériens, antifongiques, antiparasitaires, antiSIDA.

Les principes actifs appartenant à ce dernier groupe seront de préférence encapsulés dans des vecteurs ayant un tropisme pour les 5 macrophages, ces vecteurs portant des apolipoprotéines B acétylées et/ou oxydées.

La structure des vecteurs particulaires leur permet d'encapsuler pratiquement n'importe quelle molécule.

La présente invention concerne également un procédé de 10 préparation d'un vecteur particulaire synthétique possédant un tropisme sélectif pour un type de cellules caractérisé en ce que :

- a) on prépare des vecteurs comportant un noyau hydrophile, une première couche de lipides et une deuxième couche de phospholipides,
- b) on encapsule un principe actif à l'intérieur du noyau hydrophile,
- c) on greffe sur la couche phospholipidique des molécules d'apolipoprotéine B purifiée à partir de LDL.

La taille des vecteurs ainsi obtenus est de l'ordre de 20nm.

L'étape c) peut notamment être réalisée par la technique de dialyse de détergent à partir d'apolipoprotéine B solubilisée sous forme de micelles. Le détergent utilisé est de préférence choisi dans le groupe des détergents dialysables: désoxycholate de sodium, octyl-B, Dglucopyranoside...

L'apolipoprotéine B est effectivement présente sur ces vecteurs et possède des propriétés physico-chimiques identiques sur ces vecteurs et sur les LDL.

Le métabolisme des vecteurs synthétiques selon l'invention a été suivi par marquage à l'iode radioactif, par immunofluorescence 30 indirecte et par microscopie électronique de transmission.

On a ainsi pu démontrer que l'apoB est bien ancrée sur les vecteurs selon l'invention et qu'elle est bien reconnue en tant que telle par le récepteur à apoB de cellules-modèles. Le métabolisme des vecteurs selon l'invention est comparable à celui des LDL naturelles.

La présente invention se rapporte également à une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comporte un vecteur particulier synthétique à tropisme sélectif et un support acceptable pour son administration.

5

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

Dans ces exemples, on se référera aux figures suivantes :

10 FIGURE 1 : Visualisation en microscopie électronique de l'apoB sur les vecteurs particulaires par réaction de Thierry.

FIGURE 2 : Détection de l'apoB sur les vecteurs particulaires par des anticorps monoclonaux.

FIGURE 3 : Visualisation du métabolisme des vecteurs particulaires selon
15 l'invention.

EXEMPLE I : PREPARATION DES NOYAUX DE POLYSACCHARIDES RETICULES A PARTIR D'UN AMYLOPECTINE

20 Dans un réacteur de 5l muni d'un piége à soude, on mélange 500g d'amylopectine avec 3l de soude 2N. Lorsque la solution est homogène, on verse 12ml d'épichlorhydrine tout en agitant vigoureusement. Le mélange réactionnel est encore agité pendant 1h puis laissé reposer pendant une nuit.

25 On obtient un gel élastique et friable. Ce gel est mis en suspension dans 10l d'eau et neutralisé par de l'acide chlorhydrique concentré et broyé mécaniquement avec un appareil à hélice (type Waring Blender) afin d'obtenir des particules de quelques dizaines de microns de diamètre.

30 Le gel obtenu est ensuite lavé par filtration sur bûchner ou centrifugation et séché par lyophilisation.

**EXEMPLE 2 : PREPARATION DE NOYAUX DE POLYSACCHARIDES
RETICULES ACIDES : FONCTIONNALISATION PAR
L'ACIDE SUCCINIQUE**

5 500g de gel polysaccharidique obtenu précédemment sont dispersés dans 5l d'eau distillée et le pH est ajusté à 8,5 par NaOH et maintenu à cette valeur par l'intermédiaire d'un pHstat. La température est maintenue au-dessous de 10°C. On ajoute séquentiellement alors 42g de monochlorure de l'acide succinique de façon à maintenir le pH autour de 8
 10 et la température en-dessous de 10°C. Lorsque tout le chlorure est ajouté, la suspension est encore agitée pendant 1h en la laissant revenir à température ambiante. Le gel obtenu est lavé par filtration sur bûchner ou par centrifugation puis séché par lyophilisation.

15 On obtient 500g de gel présentant un taux de substitution de 0,05 équivalent par sucre déterminé par titration.

Par suite de la répulsion existant entre les charges de même signe, les substituants ioniques sont répartis de façon homogène dans le volume du gel.

20 Le taux de substitution ionique peut être facilement ajusté en augmentant la quantité stoechiométrique de monochlorure de l'acide succinique par rapport à la matrice polysaccharidique.

25	Rapport monochlorure/matrice PS	0,25	0,33	1
30	Taux de substitution	0,13	0,17	0,48

**EXEMPLE 3 : OBTENTION DE NOYAUX POLYSACCHARIDIQUES SUC-
CINYLES DE 20nm DE DIAMETRE**

500g de gel obtenu précédemment sont dispersés dans 5l d'eau distillée et homogénéisés au moyen d'un homogénéisateur Rannie 12-51 H. La pression d'homogénéisation est de 900 bars et le débit de 80l/h.

On obtient une suspension fluide de nanoparticules de
5 polysaccharides réticulés acides dont la taille, mesurée par un nanosizer Coulter N4MD, est centrée autour de 20nm. Les nanoparticules sont alors séchées à l'aide d'un atomiseur Büchi 190 en présence de 5% de NH_4HCO_3 . La concentration des particules est de 5%, la température de l'air de séchage est de 200°C.

10

EXEMPLE 4 : PREPARATION DE LA COURONNE LIPIDIQUE

100g de nanoparticules atomisées de diamètre moyen 20nm, obtenues précédemment, sont mis en suspension dans 500ml de dichlorométhane anhydre. On ajoute ensuite 50g de chlorure d'acide palmitique et 50g de carbonate de soude sec. L'ensemble est laissé sous forte agitation à reflux et à l'abri de l'humidité pendant 48h.

Le dichlorométhane est alors évaporé et les particules acylées sont lavées d'abord par un mélange acide acétique 2% / méthanol (10/90) puis 2 fois par du méthanol. Entre chaque lavage, les particules sont récupérées par centrifugation.

Les particules sont finalement obtenues à l'état sec par évaporation du méthanol à l'évaporateur rotatif sous pression réduite. Le taux de greffage d'acide gras sur les noyaux polysaccharidiques est déterminé par la méthode de Lauwerys et est de 10% en poids.

EXEMPLE 5 : ETABLISSEMENT DU FEUILLET PHOSPHOLIPIDIQUE EXTERNE

30 1g de particules ioniques acylées obtenues précédemment (20nm / 0,05 ligand ionique par unité glucose / 10% d'acide palmitique) est dispersé dans 5ml d'éthanol. La suspension résultante est injectée à l'aide d'une seringue dans une suspension de liposomes unilamellaires réalisée à

35

partir d'un gramme de phospholipides (lécithines de jaune d'oeuf purifiées-Sigma Chemical Company) et 100ml d'eau distillée. Les liposomes sont préparés par la méthode classique du ballon puis soniqués 1h au bain pour obtenir des liposomes unilamellaire.

5

EXEMPLE 6 : PREPARATION DES NOYAUX DE POLYSACCHARIDES RETICULES A PARTIR D'AMIDON SOLUBLE

Dans un réacteur de 5l muni d'un piège à soude, on mélange
10 500g d'amidon soluble (Prolabo) avec 2l de soude 2N. Lorsque la solution est homogène, on verse 12ml d'épichlorhydrine tout en agitant vigoureusement. Le mélange réactionnel est agité pendant 1h et puis laissé reposé pendant une nuit.

On obtient un gel élastique qui est mis en suspension dans 10l
15 d'eau et neutralisé par de l'acide chlorhydrique concentré. Ce gel est ensuite broyé mécaniquement avec un appareil à hélice (type Waring Blender) afin d'obtenir des particules de quelques dizaines de microns de diamètre.

Le gel obtenu est ensuite lavé par filtration sur büchner ou
20 par centrifugation et séché par lyophilisation.

EXEMPLE 7 : FONCTIONNALISATION PAR L'ACIDE PHOSPHORIQUE

500g du gel polysaccharidique obtenu selon l'exemple 6 sont
25 suspendus dans 2 litres de soude 2M et refroidis à 0°C. On ajoute progressivement sous agitation 240g d'oxychlorure de phosphore (POCl₃, 1,55 mol) et 550ml de NaOH 10M de façon à ce que les deux réactifs soient ajoutés de façon simultanée. La température est maintenue en-dessous de 10°C. Après la fin de l'addition, le mélange est agité encore pendant deux
30 heures en le laissant revenir à température ambiante. Le mélange est ensuite neutralisé par l'acide chlorhydrique, filtré sur büchner et lavé avec de l'eau distillée jusqu'à neutralité.

On obtient après lyophilisation 550g (rdt. 91%) de gel ionique. Le taux de greffage est déterminé par titration à la soude 0,1N avec la phénolphthaleïne comme indicateur. On trouve 1,5 mEq de charges négatives par gramme de gel.

5

EXEMPLE 8 : OBTENTION DE NOYAUX POLYSACCHARIDIQUES PHOSPHORYLES DE 20nm DE DIAMETRE

100g du gel phosphorylé obtenu selon l'exemple 7 sont dispersés dans 10l d'eau distillée et homogénéisés au moyen d'un homogénéisateur Rannie 12-51 H. La pression d'homogénéisation est de 900 bars et le débit de 80 l/h.

10 15 On obtient une suspension fluide de nanoparticules de polysaccharides réticulés acides dont la taille, mesurée par un nanosizer Coulter N4MD, est centrée autour de 20nm. Les nanoparticules sont alors séchées par lyophilisation en présence de 50g/l de bicarbonate d'ammonium.

20 EXEMPLE 9 : PREPARATION DE LA COURONNE LIPIDIQUE PAR LA METHODE DES ACYLATIONS MULTIPLES

10g de particules de 20nm obtenues selon l'exemple 8 sont dispersées dans 30ml de dichlorométhane. On ajoute 1,7g de chlorure d'acide palmitique. Un réfrigérant muni d'une garde au carbonate de potassium est adapté sur le flacon réactionnel et la réaction est agitée énergiquement à reflux pendant une nuit. Le dichlorométhane est ensuite évaporé avec un évaporateur rotatif et le résidu est lavé plusieurs fois par l'éthanol puis séché sous vide. On obtient 10,3g de particules acylées (rdt. 98%). Le taux d'acides gras greffés mesuré après saponification des particules est de 5%.

30 35 10g des particules acylées obtenues sont remises en suspension sous forte agitation dans 1 litre d'eau. Une fois que la dispersion est homogène, les particules sont à nouveau lyophilisées en présence de bicarbonate d'ammonium à 50g/l.

Les particules sont dispersées dans 30ml de dichlorométhane et réacylées suivant le protocole décrit précédemment. On obtient, après lavage, 9,5g de particules (rdt. 94%) avec un taux d'acides gras mesuré à 6%.

5 Un troisième cycle réactionnel, comprenant toutes les étapes déjà décrites (hydratation, lyophilisation, réacylation) conduit à 9g de particules acylées (rdt. total 88%) avec un taux d'acide gras de 6,5%.

10 EXEMPLE 10 :ETABLISSEMENT DU FEUILLET PHOSPHOLIPIDIQUE SUR
DES COEURS ACYLES DE 20nm PAR LA METHODE DE
DIALYSE DE DETERGENT

La composition du feuillet phospholipidique utilisé est similaire à celle des LDL et est la suivante: (mélange type LDL)

15 - 53% de lécitihines de jaune d'oeuf purifiées (EYPC)
- 20% de sphingomyéline (SM)
-4% de phosphatidylsérine (PS)
-3% de lysophosphatidylcholine (LPC)
-20% de cholestérol

20 (Sigma Chemical Company)

Les lipides sont mélangés à l'état sec avec le détergent (53mg d'EYPC, 20mg de SM, 20mg de cholestérol, 4Mg de PS, 3mg de LPC et 292mg d'octyl-B, Dglucopyrannoside) et solubilisés dans 2ml de chloroforme. Le solvant est éliminé par évaporation rotative pour obtenir un film uniforme. Les lipides et le détergent sont ensuite hydratés peu à peu à l'aide d'une solution d'EDTA 1mM, pH=7 (20 Ml) sous agitation magnétique. La suspension obtenue est alors soumise aux ultra-sons dans un bain à 45°C pendant 15mn sous atmosphère inerte.

25 Les coeurs acylés (10mg) préparés selon l'exemple 9, dispersés dans 2ml d'octyl-B, D-glucopyrannoside sont mélangés aux lipides (7,5mg/ 1,5ml) sous ultra-sons puis dilués brutalement sous la CMC par injection dans 16ml d'EDTA 1mM, pH7. Le détergent est ensuite éliminé par 48h de dialyse contre une solution d'EDTA 1mM, pH=7.

EXEMPLE 11 :INCORPORATION DANS LES BVSM, D'UN AGENT ANTI-BACTERIEN : LA BUTIROSINE

5 La butirosine est un antibiotique de la famille des aminoglycosides. C'est une molécule constituée d'un aminocyclitol lié par des liaisons glycosidiques à des sucres aminés. Il s'agit d'un produit très polaire et basique soluble uniquement dans l'eau. Son poids moléculaire est de 556.

10 a) On prépare d'abord des noyaux acylés acides de 20nm caractérisés par un taux de greffage ionique correspondant à un acide succinique pour 5 sucres et préparés selon l'exemple 4. La couronne lipidique est constituée d'acide palmitique avec un taux de 10% par rapport à la matrice polysaccharidique.

15 On mélange à l'état sec 1g de noyaux acylés et 0,5g de butirosine base (Park Davis). Le mélange est ensuite hydraté progressivement par ajout d'eau distillée. Le mélange est maintenu constamment agité et à 50°C. On ajoute ainsi 10ml d'eau en laissant le mélange revenir à température ambiante et on laisse encore 2h.

20 La suspension est ensuite lyophilisée. Le résidu sec est dispersé dans 5ml d'éthanol et ajouté à une suspension de liposomes unilamellaires (1g de lécithines de jaune d'oeuf purifiées dans 50ml d'eau distillée). Après sonication au bain pendant 1h, la suspension est ultrafiltrée et la butirosine libre présente dans l'ultrafiltrat est dosée par HPLC. Les résultats indiquent la présence de 25mg de butirosine dans l'ultrafiltrat, ce qui correspond à un rendement d'incorporation de 95% et un taux d'incorporation de 47,5% en poids par rapport au cœur acylé.

30 b) Dans un premier temps, des noyaux acylés acides de 20nm sont préparés selon l'exemple 9. On mélange ensuite, 50mg de noyaux acylés avec 25mg de butirosine base (Park-Davis) dilués dans 1ml d'eau distillée. Le mélange est maintenu constamment agité à température ambiante, pendant une nuit.

35 La suspension obtenue est dispersée en présence d'Octyl-β-D-Glucopyranoside (OGP) (Fluka) jusqu'à une molarité finale de 50mM

et est ajoutée goutte à goutte à une solution de phospholipides (50mg d'un mélange de lécithines de jaune d'oeuf purifiées / cholestérol (80/20) w/w, dispersés dans 10ml d'OGP 50mM). Après sonication au bain pendant 10 minutes, cette solution est brutalement diluée sous Ultra-Sons jusqu'à une 5 molarité de 5mM en OGP puis, ultrafiltrée (point de coupure: 30 000 daltons). Les BVSM obtenus sont alors stérilisés sur filtres 0,22µm. L'analyse de taille effectuée au nanosizer (Coulter N4 SD) indique que 99% de ces BVSM ont un diamètre de 20nm (+/-2nm).

La butirosine libre présente dans le filtrat est dosée par 10 microbiologie. La concentration de l'antibiotique est déterminée par la mesure de l'aire d'inhibition de la croissance de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Les résultats indiquent la présence de 2,5mg de butirosine libre dans l'ultrafiltrat, ce qui correspond à un rendement d'incorporation de 90% de butirosine et à un taux d'incorporation de 45% en poids de butirosine par 15 rapport au poids de coeurs acylés.

Les BVSM ainsi obtenus sont stérilisés par filtration sur 0,2µm et présentent un rendement de filtration de 95%. L'analyse de la taille est réalisée à l'aide d'un nanosizer (Coulter N4SD) et donne une répartition de 95% à 20nm+/-3nm.

20

EXEMPLE 12 : INCORPORATION D'UN AGENT ANTI-CANCEREUX, LA DOXORUBICINE, DANS LES BVSM

La doxorubicine (Adriamycine [®]) est un antibiotique 25 anticancéreux appartenant à la famille des anthracyclines. C'est un produit amphiphile caractérisé par un aglycone polyaromatique conférant à la molécule des propriétés de fluorescence caractéristiques et par un sucre aminé, la daunosamine. Le poids moléculaire du chlorhydrate de doxo- 30 rubicine est de 580.

30

a) On utilise les noyaux acylés succinylés avec l'acide succinique sous forme de sel de sodium préparés selon l'exemple 4.

On mélange à l'état sec 1g de noyaux acylés et 0,7g de chlorhydrate de doxorubicine (Sigma Chemical Company). Le mélange est ensuite hydraté progressivement par 10ml d'eau distillée sous agitation et à température ambiante. Il est ensuite agité pendant 2h à température ambiante.

La suspension obtenue est lyophilisée. Le résidu sec est dispersé dans 5ml d'éthanol et ajouté à une suspension de liposomes unilamellaires (3g de lécithines de jaune d'oeuf purifiées dans 50ml d'eau distillée). Après sonication au bain pendant 1h, la suspension est ultrafiltrée et la doxorubicine libre présente dans l'ultrafiltrat est dosée par HPLC. Les résultats indiquent la présence de 28mg de doxorubicine dans l'ultrafiltrat, ce qui correspond à un rendement d'encapsulation de 96% et un taux d'encapsulation de 67% en poids par rapport aux noyaux acylés.

15

b) On utilise les noyaux acylés décrits dans l'exemple 9.

On disperse 0,5g de noyaux acylés dans 10ml d'éthanol. 0,20g de doxorubicine (Sigma Chemical Company) en solution aqueuse est ajoutée progressivement à la suspension de noyaux acylés sous agitation. Le mélange obtenu est ensuite agité pendant 2h à température ambiante et à l'abri de la lumière.

De l'éthanol est ajouté à la suspension de noyaux acylés ainsi incorporés pour obtenir un taux de 75% en volume. Les noyaux acylés sont récupérés par centrifugation (10 000g-15min) et séchés. La doxorubicine libre est dosée par HPLC et les résultats indiquent la présence de 4mg de doxorubicine dans le surnageant. Le taux de chargement de la doxorubicine dans les coeurs acylés est de 39% et le rendement en doxorubicine est de 98%.

Le résidu sec est repris par 175ml d'octyl-B, Dglucopyranoside (OGP-Sigma Chemical Company) 50mM contenant 0,375g de phospholipides type LDL et dispersé au bain à ultra-sons. La suspension obtenue est ensuite injectée sous la sonde à ultra-sons dans 700ml d'eau distillée pour descendre à 10mM en OGP sous la CMC. Les BVSM chargés en doxorubicine ainsi formés sont dialysés extensivement pour éliminer le détergent. Ils sont ensuite stérilisés par filtration sur 0,2µm.

La doxorubicine incorporée est dosée par HPLC après relargage dans une solution de NaH_2PO_4 2M / éthanol - 70/30. Les résultats indiquent la présence de 0,17g de doxorubicine incorporée dans les BVSM et correspondent à un taux de chargement de 34% par rapport aux noyaux acylés et un rendement en doxorubicine de 85%.

Les BVSM ainsi incorporés en doxorubicine ont été analysés en perméation de gel sur colonne TSK G6000PW pour évaluer leur taille. Le profil chromatographique de ces BVSM montre que leur taille est la même que celle des BVSM sans doxorubicine présentant une répartition de taille de 95% à 20nm+/-3nm.

EXEMPLE 13 : INCORPORATION D'UN AGENT ANTIVIRAL, LA ZIDOVUDINE, DANS LES BVSM

La zidovudine ou azido-3 désoxythymidine (AZT) possède un caractère basique par son noyau thymidine. C'est un inhibiteur de la transcriptase inverse et utilisé comme agent antiviral, notamment dans le traitement du SIDA. Son poids moléculaire est de 267.

a) On utilise les mêmes noyaux que dans l'exemple 11 a).

On mélange à l'état sec 1g de noyaux acylés et 0,33g de zidovudine (Sigma Chemical Company). Le mélange est ensuite hydraté progressivement par 10ml d'eau distillée sous agitation et à température ambiante. Il est ensuite agité pendant 2h à température ambiante.

La suspension obtenue est lyophilisée. Le résidu sec est dispersé dans de l'éthanol et ajoutée à une suspension de liposomes unilamellaires (3g de lécithines de jaune d'oeuf purifiées dans 50ml d'eau distillée). Après 1h de sonication au bain, la suspension est ultrafiltrée et la zidovudine libre présente dans l'ultrafiltrat est dosée par HPLC. Les résultats indiquent la présence de 30mg de zidovudine dans l'ultrafiltrat, ce qui correspond à un rendement d'encapsulation de 91% et un taux d'encapsulation de 30% en poids par rapport aux noyaux acylés.

b) On utilise les noyaux acylés selon l'exemple 9.

On disperse 0,5g de noyaux acylés dans 10ml d'éthanol. 0,150g de zidovudine (Sigma Chemical Company) en solution aqueuse est ajouté progressivement à la suspension de noyaux acylés sous agitation. Le 5 mélange obtenu est ensuite agité pendant 2h à température ambiante.

De l'éthanol est ajouté à la suspension de noyaux acylés ainsi incorporés pour obtenir un taux de 75% en volume. Les noyaux acylés sont récupérés par centrifugation (10 00g-15min) et séchés. La zidovudine libre est dosée par HPLC et les résultats indiquent la présence de 15mg dans le 10 surnageant. Le taux de chargement de la zidovudine dans les coeurs acylés est donc de 27% et le rendement en zidovudine est de 95%.

Le résidu sec est repris par 175ml d'octyl-B, Dglucopyranoside (OGP-Sigma Chemical Company) 50mM contenant 0,375g de phospholipides type LDL et dispersé au bain à ultra-sons. La suspension 15 obtenue est ensuite injectée sous la sonde à ultra-sons dans 700ml d'eau distillée pour descendre à 10mM en OGP. Les BVSM chargés en zidovudine ainsi formés sont dialysés extensivement pour éliminer le détergent. Ils sont ensuite filtrés sur membrane 0,2µm de manière stérile.

La zidovudine incorporée est dosée par HPLC après relargage 20 dans une solution de NaH_2PO_4 2M / éthanol - 70/30. Les résultats indiquent la présence de 0,128g de zidovudine incorporée dans les BVSM et correspondent à un taux de chargement de 26% par rapport aux noyaux acylés et un rendement en zidovudine de 85%.

25 **EXEMPLE 14 :INCORPORATION D'UN AGENT ANTIMYCOBACTERIEN,
L'ISONIAZIDE, DANS LES BVSM**

L'isoniazide est le dérivé hydrazide de l'acide isonicotinique, ce qui lui confère un caractère basique. Il est très efficace dans le 30 traitement de la tuberculose. Son poids moléculaire est de 137.

a) Les noyaux utilisés sont ceux décrits dans l'exemple 11 a).

On mélange à l'état sec 1g de noyaux acylés et 0,17g d'isoniazide. Le mélange est ensuite hydraté progressivement par 10ml d'eau distillé à 40°C et agité à cette température et pendant 1h. On laisse le mélange revenir à température ambiante sous agitation pendant 1h.

5 La suspension est ensuite lyophilisée. Le résidu sec est dispersé dans de l'éthanol et ajouté à une suspension de liposomes unilamellaires (3g de lécithines de jaune d'oeuf purifiées dans 50ml d'eau). Après sonication au bain pendant 1h, la suspension est ultrafiltré et l'isoniazide libre présent dans l'ultrafiltrat est dosé par HPLC. Les résultats
10 indiquent la présence de 15mg d'isoniazide dans l'ultrafiltrat, ce qui correspond à un rendement de 91% et un taux d'incorporation de 15,5% en poids par rapport aux noyaux acylés.

b) Les noyaux utilisés sont les mêmes que ceux décrits dans
15 l'exemple 9.

On disperse 0,5g de noyaux acylés dans 10ml d'éthanol. 0,10g d'isoniazide (Sigma Chemical Company) en solution aqueuse est ajouté progressivement à la suspension de noyaux acylés sous agitation. Le mélange obtenu est ensuite agité pendant 1h à température ambiante.
20

De l'éthanol est ajouté à la suspension de noyaux acylés ainsi incorporés pour obtenir un taux de 75% en volume. Les noyaux acylés sont récupérés par centrifugation (10 000g - 15min) et séchés. L'isoniazide libre est dosée par HPLC et les résultats indiquent la présence de 4mg dans le surnageant. Le taux de chargement d'isoniazide dans les coeurs acylés est
25 de 19% par rapport aux noyaux acylés et un rendement de 96%.

Le résidu sec est repris par 175ml d'octyl-B, D-glucopyronoside (OGP Sigma Chemical Company) 50mM contenant 0,375g de phospholipides type LDL et dispersé au bain à ultra-sons. La suspension obtenue est ensuite injectée sous la sonde à ultra-sons dans 700ml d'eau distillée pour descendre à 10mM en OGP. Les BVSM chargés en isoniazide ainsi formés sont dialysés extensivement pour éliminer le détergent.
30

L'isoniazide incorporée est dosée par HPLC après relargage dans une solution de NaH_2PO_4 2M / éthanol - 70/30. Les résultats indiquent la présence de 0,087g d'isoniazide incorporée dans les BVSM et correspondent à un taux de chargement de 17% par rapport aux noyaux acylés et un rendement en isoniazide de 87%.

EXEMPLE 15 :GREFFAGE DE L'apoB SUR LES BVSM PAR LA METHODE DE DIALYSE DE DETERGENT

10 Les LDL utilisées sont extraites à partir de plasma sanguin de donneurs sains par ultra-centrifugation séquentielle en gradient de KBr.

15 Les BVSM utilisés sont synthétisés selon le protocole décrit précédemment à l'exemple 5 et possèdent les caractéristiques suivantes : coeur polysaccharidique acide à 0,05 ligand ionique par unité glucose, 10% d'acide palmitique, un feuillet phospholipidique qui est composé de 75% de dimyristoyl phosphatidyl choline et de 25% de sphingomyeline (% en poids) plus 10% de cholestérol (% par rapport au poids de phospholipides) pour les BVSM complets ou de lécithines de jaune d'oeuf pour les BVSM déficients en phospholipides. La taille des BVSM est de 20nm et le rapport coeur acylé/phospholipides est de 1/3 en poids.

20 Les quantités de LDL sont données en milligramme d'apoB dosée par turbidimétrie (croissance de la densité optique à 500nm due à la précipitation de l'apoB par un anticorps anti-apoB).

25 Ces données sont valables pour tous les exemples de greffage de l'apoB sur les BVSM.

30 Les LDL (3mg/0,5ml), préalablement dialysées contre une solution de tampon A (Na_2CO_3 50 mM, pH=10), sont déstructurées par du désoxycholate de sodium (NaDC) (165mg) dans les proportions suivantes : 55 fois plus en poids que l'apoB et en ajustant le volume final pour obtenir une concentration finale en NaDC de 180mg/ml. La solution est vortexée pendant 1min puis agitée doucement pendant 1h à température ambiante. Le NaDC permet de déstructurer entièrement les LDL et de solubiliser l'apoB par l'intermédiaire de micelles de détergent dans des conditions non-dénaturantes.

Les différents constituants des LDL sont ensuite séparés selon leur poids moléculaire par gel-filtration (système FPLC de Pharmacia, colonne Superose 6 1,5cm x 30cm, phase mobile tampon B : tampon A + NaDC 10mM, débit 25ml/h) et collectés par fraction de 1ml. L'apoB se trouve sous forme de micelles mixtes de détergent, ce qui augmente son poids moléculaire apparent. Aussi elle est éluée dans le volume mort de la colonne. Les fractions contenant l'apoB sont déterminées par dosage des protéines puis rassemblées. Le rendement d'extraction de l'apoB est de 95% à 100%.

La solution de micelles d'apoB et de NaDC est ajoutée goutte-à-goutte à la suspension de BVSM (19,3mg/2ml dont 4,5mg de coeurs acylés et 13,5mg de DMPC et de sphingomyeline(75%-25%) et 0,9 mg de cholestérol) mise en dialyse contre du tampon A. La suspension obtenue est ensuite dialysée contre du tampon A pendant 48h pour éliminer tout le NaDC.

La suspension obtenue est centrifugée à 5000g pendant 15min. Les BVSM-apoB (2,6mg d'apoB et 4,0mg de coeurs acylés) sont récupérés dans le surnageant.

Le désoxycholate de sodium peut être remplacé par tout autre détergent dialysable.

EXEMPLE 16 : GREFFAGE DE L'apoB PAR ELIMINATION DE DETERGENT EN DEUX ETAPES

Cet exemple est une variante de l'exemple 1 où le détergent est éliminé en grande partie par perméation de gel puis par dialyse. Les BVSM utilisés sont les mêmes que précédemment.

Les LDL (3mg/0,5ml), préalablement dialysées contre une solution de tampon A (Na_2CO_3 50m M, NaCl 50 mM, pH=10), sont déstructurées par du désoxycholate de sodium (NaDC) (165mg) dans les proportions suivantes: 55 fois plus en poids que l'apoB et en ajustant le volume final pour obtenir une concentration finale en NaDC de 180mg/ml. La solution est vortexée pendant 1min puis agitée doucement pendant 1 h à température ambiante.

Les différents constituants des LDL sont ensuite séparés selon leur poids moléculaire par gel-filtration (système Pharmacia, colonne Sepharose CL-4B 1, 6cm x 60cm, phase mobile tampon B) et collectés par friction de 1ml. Les fractions contenant l'apoB sont déterminées par dosage des protéines puis rassemblées.. L'excès de NaDC est ensuite éliminé par perméation de gel sur une colonne de Sephadex G-75 (1,6cm x30cm), équilibré et éluee par du tampon Tris-HCl 10mM à pH 9, pour obtenir l'apoB avec le minimum de NaDC nécessaire à la solubiliser en solution aqueuse de manière non dénaturante.

La solution d'apoB est ajoutée à une suspension de BVSM (19,3mg/2ml) puis soniquée au bain pendant 15min à37°C. La suspension obtenue est dialysée pendant 48h contre du tampon A pour éliminer le NaDC.

La suspension obtenue est centrifugée à 5000g pendant 15min. Les BVSM-apoB (2,8mg d'apoB et 4,0mg de coeurs acylés) sont récupérés dans le surnageant.

EXEMPLE 17 :GREFFAGE DE L'apoB AVEC SON ENVIRONNEMENT
PHOSPHOLIPIDIQUE SUR LES BVSM APRES EXTRACTION
ORGANIQUE DU COEUR HYDROPHOBE DES LDL

Les LDL (2mg d'apoB/3ml), préalablement dialysées contre une solution d'EDTA à 3mM ajustée à pH=8, sont lyophilisées en présence de lactose (100mg) pendant 18h. Le lactose évite l'agrégation des LDL et la dénaturation de l'apoB.

Le lyophilisat est dispersé grossièrement dans de l'heptane (5ml) sous agitation magnétique puis centrifugé à 1000g pendant 10min. Le surnageant contenant les lipides du cœur hydrophobe des LDL est éliminé et le culot est extrait encore 2 fois dans les mêmes conditions. L'heptane permet d'extraire sélectivement les esters de cholestérol et les triglycérides sans enlever les phospholipides. Le lyophilisat ainsi qui contient l'apoB entourée du feuillet phospholipidique des LDL est ensuite séché sous courant d'azote.

Les coeurs acylés des BVSM en suspension dans de l'éther éthylique (3mg/1,5ml) sont ajoutés au lyophilisat et agités doucement à température ambiante pendant 1h. L'éther éthylique est ensuite évaporé à sec sous courant d'azote puis sous vide.

5 La poudre ainsi obtenue est réhydratée sous agitation à 37°C avec 2ml de tampon Tris-Glycine 10mM à pH=8 et soniquée pendant 3min au bain à ultra-sons. L'apoB est ainsi greffée en même temps que le feuillet phospholipidique sur les coeurs acylés. La suspension obtenue est homogénéisée sous agitation magnétique pendant 12h à 4°C puis dialysée
10 contre du tampon (NaCl 150mM, Tris 50mM, EDTA 4%, pH=8) pour éliminer le lactose.

La suspension obtenue est centrifugée à 5000g pendant 15min. Les BVSM-apoB (1,6mg d'apoB et 2,5mg de coeurs acylés) sont récupérés dans le surnageant.

15 Le lactose utilisé dans cet exemple peut être substitué par le saccharose, le glucose ou tout autre sucre. Tout solvant organique solubilisant les lipides du cœur hydrophobe des LDL peut convenir à la place de l'heptane : hexane,...

20 **EXEMPLE 18 : GREFFAGE DE L'apoB AVEC SON ENVIRONNEMENT PHOSPHOLIPIDIQUE SUR LES BVSM APRES HYDROLYSE ENZYMATIQUE PARTIELLE DES LDL**

25 Les LDL (2mg), préalablement dialysées contre du tampon I (K_2HPO_4 - KH_2PO_4 100mM, pH=7,4) sont mises en présence de stérol-ester hydrolase (EC3.1.1.13 de *Pseudomonas fluorescens*) (2 unités) et de sérum albumine bovine délipidée (2 à 10mg). La solution est incubée pendant 2h à 37°C sous agitation. L'enzyme, en hydrolysant les esters de cholestérol, déstructure légèrement les LDL et l'albumine capte les lipides ainsi libérés.
30 Dans ces conditions, l'apoB est isolée de manière non-dénaturante avec son environnement phospholipidique qui la protège.

L'apoB ainsi isolée est lavée 3 fois avec du tampon I (20ml) par ultra-filtration (système Amicon) sur membrane de seuil de coupure de 300 000 en poids moléculaire pour éliminer l'enzyme et l'albumine chargée en lipides.

5 L'apoB obtenue est ajoutée sous ultra-sons à la suspension de BVSM, synthétisés avec un défaut de 20% en phospholipides, et soniquée pendant 15min à 37°C. La suspension obtenue est centrifugée à 5000g pendant 15min. Les BVSM-apoB (1,8mg d'apoB et 2,5mg de coeurs acylés) sont récupérés dans le surnageant.

10

EXEMPLE 19 : CARACTERISATION DES BVSM-apoB

Pour chacune des analyses suivantes, nous avons réalisé des tests avec des LDL pour vérifier que les BVSM-apoB ont le même comportement que les LDL et avec des BVSM comme témoin négatif.

20

Détection de l'apoB sur les BVSM-apoB

-méthode cytochimique : visualisation des polysaccharides par la méthode de Thierry

25

L'apoB et les BVSM sont détectés par la réaction de Thierry qui met en évidence les sucres (oxydation périodique des sucres, condensation avec de la thiocarbohydrazide et complexation par le protéinate d'argent) : l'apoB est glycosilée et les BVSM possèdent un cœur polysaccharidique. L'observation en microscopie électronique de transmission permet de visualiser l'apoB et les coeurs polysaccharidiques (figure 1).

30

Les LDL ou les BVSM-apoB sont déposées sur une grille de microscopie électronique recouverte en or. La grille est ensuite déposée pendant 45min sur des gouttes d'acide périodique 1% fraîchement préparé. Après avoir été rincée 3 fois 10min avec de l'eau distillée, la grille est mise à l'obscurité dans des salières contenant de la thiosemicarbazide 1%

35

5 dans de l'acide acétique 10%. Après 66 ou 72h, la grille est lavée par des bains successifs d'acide acétique de 10-5-2,5-1% puis par 3 bains d'eau distillée. Ensuite les particules sont colorées avec du protéinate d'argent à 1% dans l'eau pendant 30min à l'obscurité et enfin rincées 3 fois 5min avec de l'eau. La grille est ensuite observée en microscopie électronique de transmission.

-méthode immunocytochimique

10 L'apoB est détectée par un anticorps polyclonal de chèvre anti-apoB et le complexe formé est révélé par la protéine G qui est couplée à un grain d'or de 5nm. L'observation en microscopie électronique de transmission met en évidence l'apoB sur les BVSM-apoB, les BVSM seuls donnant une réponse négative. (figure 2).

15 Les LDL ou les BVSM-apoB sont déposés sur une grille de microscopie électronique recouverte d'un support en nickel puis lavés 3 fois 5min à l'eau distillée. La grille est ensuite incubée 1h à température ambiante en présence d'anticorps polyclonal anti-apoB de chèvre (Tebu) qui est dilué au 1/200ième à partir de la solution-mère à 8mg/ml. La grille est 20 ensuite rincée 6 fois 5min avec un mélange PBS + 1% BSA. Pour révéler l'anticorps fixé, nous utilisons la protéine G diluée au 1/20ième à laquelle des particules d'or de 5nm sont absorbées (Janssen). Après 3 bains de 5min dans du PBS + 1% BSA, dans du PBS seul puis de l'eau distillée, les particules sont observées au microscope électronique.

25

-mesure de la taille des BVSM-apoB

30 L'observation en microscopie électronique de transmission et l'analyseur de particules submicroniques par diffusion de la lumière (Nanosizer Coulter N4MD) donnent une répartition en taille à plus de 95% à 20nm pour les BVSM-apoB.

-profil électrophorétique des BVSM-apoB

L'électrophorèse est réalisée sur gel de polyacrylamide-SDS 4%. L'apoB greffée sur les BVSM et celle des LDL présentent la même migration électrophorétique. Celle-ci est conforme à la connaissance du poids moléculaire apparent de l'apoB. Aucune agrégation et aucun fragments de l'apoB n'apparaissent.

-détermination de la densité des BVSM-apoB

La densité des BVSM-apoB est déterminée par ultra-centrifugation en gradient discontinu de KBr.

Les suspensions de LDL ou de BVSM-apoB (1mg/1mg/1,5ml) dont la densité est ajustée à 1,21 par du KBr solide sont déposées au fond d'un tube pour ultra-centrifugation puis recouvertes par des solutions de KBr (0,5ml) aux densités suivantes: 1,063-1,040-1,019-1,006. Les tubes sont ensuite ultracentrifugés à 50000g pendant 18h. Les BVSM-apoB flottent entre les densités 1,019 et 1,040 et cette plage de densité est du même ordre que celle des LDL. L'analyse des fractions du gradient en apoB et en radioactivité (coeur acylé marqué au ³H) montre que tous les BVSM-apoB se trouvent bien entre ces deux densités.

-étude du métabolisme cellulaire des BVSM-apoB

Cette étude est réalisée sur des cellules-modèles, les fibroblastes de peau humaine.

- par radiomarquage de l'apoB

Après radiomarquage de l'apoB par l'¹²⁵I, nous avons quantifié la fixation, l'internalisation et la dégradation des BVSM-apoB selon la technique de Brown et Golstein (J.Biol.Chem. (1974) 249,5153-5162).

Les BVSM-apoB (1mg d'apoB/1ml) sont mélangés à 0,25ml de tampon glycine pH 9,1 et à 10ul d'¹²⁵I (Ammersham). 3ul de solution d'ICl 1,25mM sont ajoutés et le mélange est ensuite agité doucement pendant 3min pour permettre l'oxydation des résidus tyrosine de l'apoB. Les 5 différents produits sont séparés par perméation de gel sur colonne Pd10 (Sephadex G-25, Pharmacia) préalablement équilibrée par une solution de NaCl 0,9% et collectés par fraction de 1ml. Ces fractions sont ensuite dosées en protéines et en radioactivité. Celles qui contiennent les BVSM-apoB radiomarqués sont réunies puis dosées de nouveau. L'activité 10 spécifique est de 175cpm/ng d'apoB.

Les fibroblastes (30 000cellules/puits) sont ensemencés dans des plaques de culture cellulaire à 6 puits (Nunc, diamètre 25mm) en milieu MEM (Gibco) contenant 10% de sérum de veau foetal (Gibco) pendant 48h puis conditionnées pendant 24h en milieu MEM contenant du sérum 15 délipoprotéiné (MEM-LPDS). Pour chaque puits, le milieu est ensuite remplacé par 1ml de MEM-LPDS contenant des quantités croissantes de BVSM-apoB radiomarqués (5 à 25ug d'apoB). En parallèle, une série de puits contenant les mêmes quantités de BVSM-apoB radiomarqués et 40 fois plus 20 de LDL non-radiomarquées est réalisée pour déterminer la fixation, l'internalisation et la dégradation non-spécifique des BVSM-apoB par les fibroblastes. Les cellules sont ensuite incubées pendant 5h à 37°C sous atmosphère contrôlée à 5% de CO₂.

La dégradation est quantifiée par la quantité d'¹²⁵I-tyrosine/ 25 cellule (cpm/mg de protéine) relarguée dans le milieu de culture, la fixation par la quantité d'¹²⁵I/cellule (cpm/mg de protéines) libérée après clivage des liaisons apoB-récepteur par l'héparine et l'internalisation par la quantité d'¹²⁵I/cellule (cpm/mg de protéines) libéré après lyse des cellules.

Ces expériences montrent que les BVSM-apoB suivent le même 30 devenir cellulaire que les LDL naturelles et présentent la même affinité cellulaire que celles-ci. Ces résultats sont confirmés par des expériences d'immunofluorescence indirecte et d'ultrastructure en microscopie électronique.

- par immunofluorescence indirecte

Les fibroblastes sont cultivés en monocouche sur des lamelles de verre placées dans des puits de culture comme précédemment et
5 incubées avec les mêmes quantités de BVSM-apoB pendant 1h à 4°C pour la fixation et 15 à 30min à 37°C pour l'internalisation.

Les cellules sont ensuite lavées par du PBS et fixées avec de la paraformaldéhyde 4% dans du PBS pendant 15min à température ambiante. Les groupements aldéhydes libres restants sont réduits par du
10 borohydrure de sodium. Les cellules sont perméabilisées avec du triton-X100 à 0,05 ou 1% dans du PBS à température ambiante puis lavées 1 fois avec du PBS et 2 fois avec du PBS + 1% BSA. Elles sont ensuite incubées pendant 1h à 37°C en présence de 150ul de solutions d'anticorps polyclonal anti-apoB de chèvre (Immuno France) diluées au 1/10^{ième} puis lavées au
.15 PBS + 1% BSA pour éliminer l'anticorps non-fixé. Le complexe apoB-anticorps ainsi formé est ensuite révélé par un anticorps secondaire anti-IgG de chèvre couplé à l'isothiocyanate de fluoroscéine (RAG-FITC, Tebu) par incubation des cellules à 37°C pendant 30min avec la solution d'anticorps secondaire diluée au 1/40^{ième}.

20 Les cellules sont ensuite observées au microscope à fluorescence (Ortholux-II Leitz). Les BVSM-apoB internalisés sont mises en évidence par les plages de fluorescence observées à l'intérieur des cellules.

25 - par microscopie électronique de transmission

La fixation aux récepteurs cellulaires et l'internalisation des BVSM-apoB sont observées en microscopie électronique de transmission soit par inclusion des cellules dans de la résine soit par révélation des sucres
30 par la méthode de Thierry comme précédemment. Cette technique visualise les différentes étapes du métabolisme : fixation des BVSM-apoB aux récepteurs, formation de puits recouverts, endocytose des BVSM-apoB dans des endosomes et dégradation par le lysosome à l'intérieur de la cellule. (cf figure 3).

Après lavage au PBS 0,1M, les cellules sont fixées pendant 1h à 0-4°C avec une solution de glutaraldéhyde 3% dans du tampon cacodylate de sodium 0,1M, pH= 7,2. Les monocouches sont alors rincées avec le tampon cacodylate de sodium puis post-fixées 1h à 0-4°C par du tétr oxyde d'osmium 1%. Les cellules sont lavées de nouveau avec du tampon cacodylate de sodium puis déshydratées par des bains successifs d'éthanol de 50, 70, 100%. Lors du passage dans l'éthanol à 70%, les cellules sont délicatement détachées de la boîte par grattage puis récupérées après 3min de centrifugation à 12000trs/min. Les deux derniers bains d'éthanol sont effectués sur les culots cellulaires. Ces échantillons sont ensuite imprégnés dans un mélange éthanol-Epon pur. La polymérisation de la résine est effectuée à 60°C pendant 72h. Les coupes ultrafines sont réalisées avec des couteaux de verre en utilisant un ultra-microtome.

Les coupes déposées sur des grilles de cuivre sont contrastées par une solution saturée d'acétate d'uranyle (20min à température ambiante), rincées à l'eau distillée puis par du citrate de plomb en atmosphère sèche. Après plusieurs rinçages à l'eau, les cellules sont observées au microscope électronique.

Les microographies montrent les différentes étapes du métabolisme cellulaire des BVSM-apoB qui est identique à celui des LDL.

EXEMPLE 20 : CARACTERISATION DES BVSM-apoB CHARGES EN DOXORUBICINE

On utilise les BVSM chargés en doxorubicine préparés selon l'exemple 12 b). Le greffage de l'apoB est réalisé selon la méthode de dialyse de détergent décrite dans l'exemple 5.

- perméation de gel

Les BVSM-apoB sont analysés par perméation de gel en FPLC sur colonne Superose 6 avec une double détection en spectrométrie à

280nm pour l'apoB et à 496nm pour la doxorubicine. Les profils chromatographiques obtenus montrent que l'apoB et la doxorubicine sont coéluées dans les mêmes fractions, correspondantes aux LDL et aux BVSM, et donc sont associées aux BVSM.

5

- cytofluorimétrie de flux

Après 48h de culture en milieu délipoprotéiné, les fibroblastes humains normaux sont incubés avec de la doxorubicine sous forme libre ou encapsulée dans des BVSM ou des BVSM-apoB. Après incubation, de 0, à 2h, ils sont lavés, mis en contact avec de la trypsine 0,05% pendant 1min à 37°C, repris en suspension dans du milieu de culture et fixés par du paraformaldéhyde. Les suspensions cellulaires obtenues sont analysées à l'aide d'un cytofluorimètre de flux (Becton-Dickinson Fac-scan) et l'incorporation cellulaire de la doxorubicine est mesurée par l'intensité de fluorescence émise. Les témoins fibroblastes avec BVSM et BVSM-apoB sans doxorubicine ne présentent aucune fluorescence.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

20

Intensité de fluorescence émise

	Temps d'incubation (min)	Doxorubicine libre	Doxorubicine BVSM	Doxorubicine BVSM-apoB
25	0	5	5	5
	10	22	25	63
	30	25	38	75
	60	31	57	95
	120	42	66	116

30

35

Les résultats présentés dans le tableau précédent indiquent que, quel que soit le temps d'incubation, l'internalisation de la doxorubicine encapsulée dans les BVSM-apoB est nettement plus importante que celle de la doxorubicine libre et de la doxorubicine encapsulée dans les BVSM. Les 5 résultats sont en faveur d'une internalisation active des BVSM-apoB par les voies du récepteur des LDL.

- test de cytotoxicité MTT

10 L'effet cytotoxique de la doxorubicine sous forme libre, de BVSM ou de BSVM-apoB, est évalué par un test qui mesure la viabilité cellulaire, le test au MTT. Celui-ci est basé sur la capacité vitale des cellules à réduire un dérivé du tétrazolium, le MTT, en formazan, par les déshydrogénases mitochondrielles présentes uniquement dans les cellules 15 vivantes et actives métaboliquement. Le formazan, après dilution dans le DMSO, est dosé par colorimétrie à 570nm.

20 Les tests de cytotoxicité sont réalisés sur une lignée tumorale d'adénocarcinome pulmonaire A549 qui possède un récepteur aux LDL fonctionnel.

25 On observe que, pour une concentration de 2 μ M, le pourcentage de cellules vivantes est de 13% pour la doxorubicine sous forme de BVSM-apoB et de 20% pour la doxorubicine sous forme de BVSM. Lorsqu'on ajoute un excès de LDL (75 fois plus en apoB que les BVSM-apoB) aux suspensions cellulaires en même temps que la doxorubicine, dans les BVSM ou les BVSM-apoB, à 2 μ M, on observe que le pourcentage de cellules vivantes est de 28% pour la doxorubicine dans les BVSM-apoB alors qu'aucun changement n'apparaît pour la doxorubicine dans les BVSM.

30 Des témoins ont été réalisés en parallèle et ont mis en évidence que la doxorubicine est bien encapsulée de manière stable à l'intérieur des BVSM, avec et sans apoB, et qu'elle n'est pas libérée après incubation dans les milieux utilisés pour la culture cellulaire. L'absence de cytotoxicité des seuls BVSM, avec ou sans apoB, a en outre été vérifiée.

Ces résultats montrent que la doxorubicine incorporée dans les BVSM-apoB conserve sa capacité d'être cytotoxique sur la lignée considérée. Après son passage dans les lysosomes, voie de pénétration intracellulaire obligée lorsque la doxorubicine est vectorisée par la voie du récepteur à apoB, la doxorubicine n'est pas détruite par les enzymes lysosomiales. Les expériences de compétition avec les LDL mettent en évidence que les BSM-apoB sont déplacés par le ligand naturel du récepteur à apoB et donc que la doxorubicine incorporée dans les BVSM-apoB est bien pilotée par l'apoB, greffée à la surface du BVSM.

10

15

20

25

30

35

R E V E N D I C A T I O N S

1) Vecteur particulaire synthétique, caractérisé en ce qu'il possède un tropisme sélectif pour un type de cellules et en ce qu'il 5 comporte :

- un noyau hydrophile non liquide,
- une première couche ou couronne de nature lipidique liée au noyau par des liaisons covalentes,
- une seconde couche ou feuillet externe de phospholipides liée 10 à la première couche par des interactions hydrophobes,
- des molécules d'apolipoprotéine B greffées sur la couche de phospholipides ou de ligands protéiques ou peptidiques capablent de reconnaître spécifiquement les récepteurs cellulaires des LDL.

15 2) Vecteur particulaire selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il possède un tropisme sélectif pour les cellules tumorales.

3) Vecteur particulaire selon la revendication 1, caractérisé en ce que les molécules d'apolipoprotéine B sont modifiées.

20 4) Vecteur particulaire selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il possède un tropisme sélectif pour les macrophages.

5) Vecteur particulaire selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le noyau hydrophile est constitué d'un polysaccharide réticulé.

25 6) Vecteur particulaire selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le polysaccharide est choisi dans le groupe comprenant le dextrane, l'amidon et la cellulose et leurs dérivés.

7) Vecteur particulaire selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la première couche de nature lipidique est fixée par acylation régiosélective d'acides gras à la périphérie d'un noyau de 30 polysaccharides réticulés.

8) Vecteur particulaire selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le noyau hydrophile comporte en outre un principe actif.

9) Vecteur particulaire selon la revendication 8, caractérisé en ce que le principe actif est choisi dans le groupe comprenant des médicaments anticancéreux, réversants de résistances aux médicaments anticancéreux, immunomodulateurs, oligonucléotides, ARN-messagers 5 antisens, hépatoprotecteurs, inhibiteurs de HMGCoAréductase, peptide de régulation cellulaire.

10) Vecteur particulaire selon la revendication 8, caractérisé en ce que le principe actif est un agent anticancéreux choisi parmi les molécules suivantes : Aclarubicine, Epirubicine, Daunorubicine, Doxorubicine, Zorubicine.

11) Vecteur particulaire selon la revendication 8, caractérisé en ce que le principe actif est choisi dans le groupe comprenant antiviraux, antibactériens, antifongiques, antiparasitaires, antiSida.

12) Vecteur particulaire selon l'une des revendications 1 à 11, 15 caractérisé en ce qu'il a une dimension d'environ 20nm.

13) Procédé de préparation d'un vecteur selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que :

20 a) on prépare des vecteurs comportant un noyau hydrophile, une première couche de lipides et une deuxième couche de phospholipides,

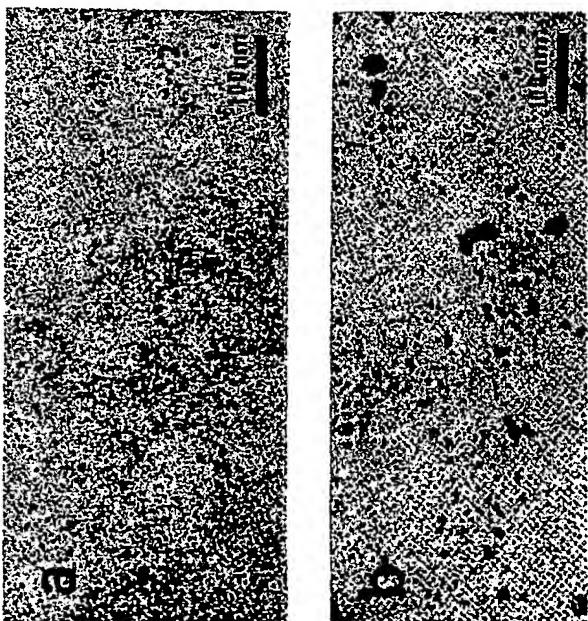
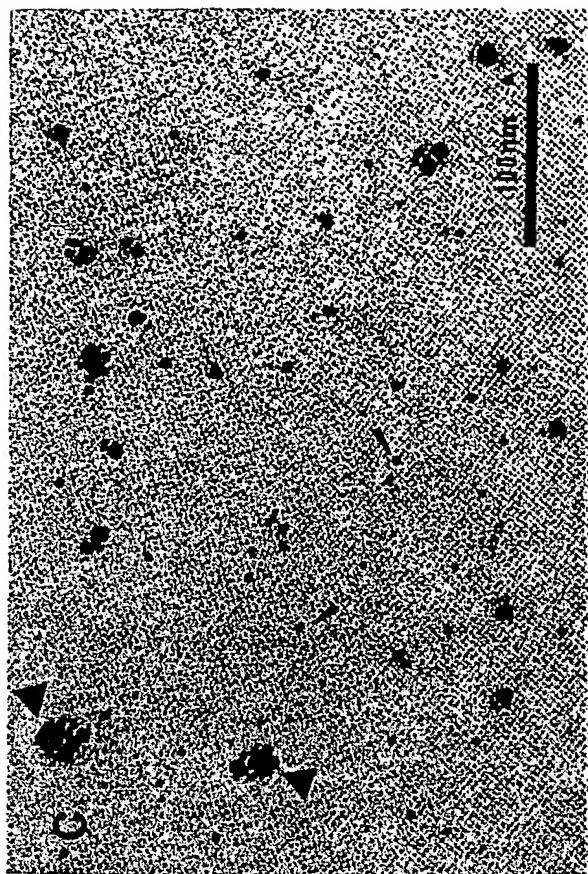
b) on encapsule un principe actif à l'intérieur du noyau hydrophile,

25 c) on greffe sur la couche phospholipidique des molécules d'apolipoprotéine B purifiée à partir de LDL ou de ligands protéiques ou peptidiques capables de reconnaître spécifiquement les récepteurs cellulaires des LDL.

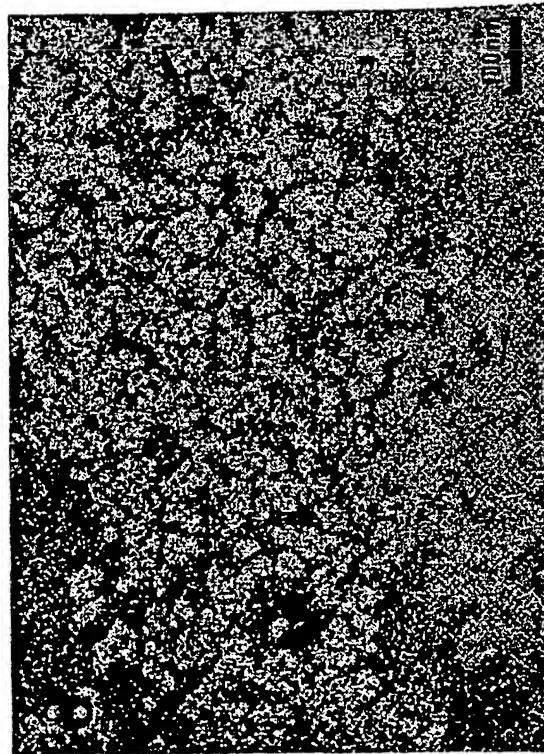
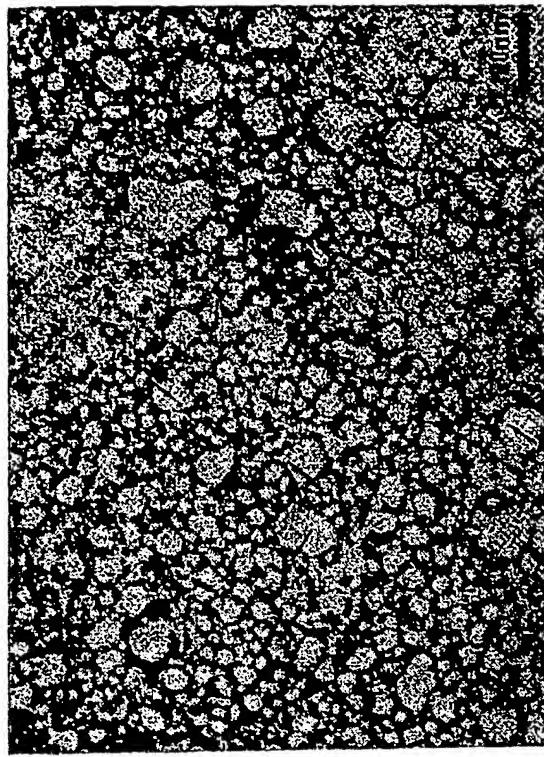
14) Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que le greffage de l'étape c) est réalisé par la technique de dialyse de détergent à partir d'apolipoprotéine B solubilisée sous forme de micelles.

30 15) Procédé selon l'une des revendications 13 et 14, caractérisé en ce que le détergent utilisé est choisi parmi les détergents dialysables.

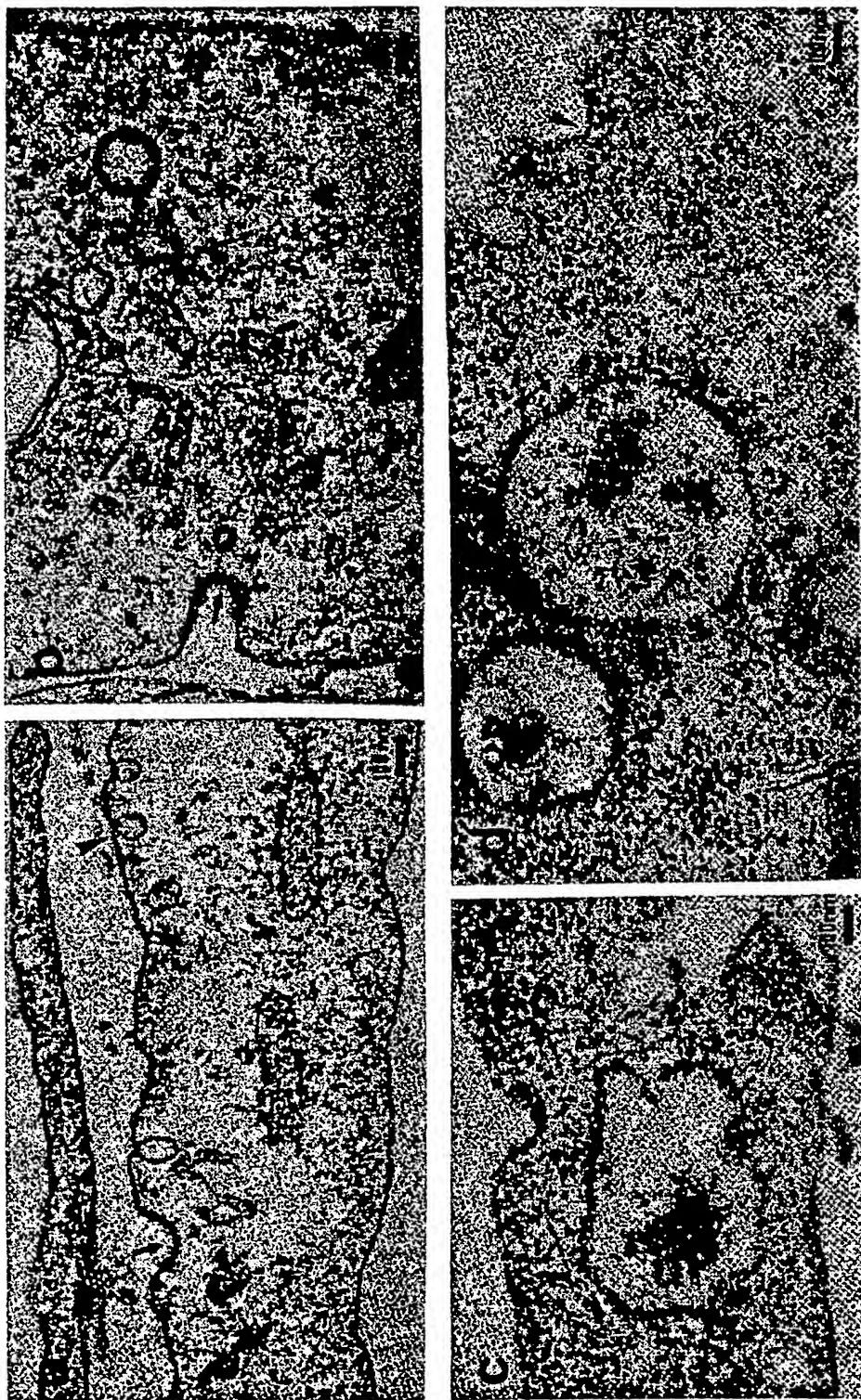
35 16) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comporte un vecteur particulaire selon l'une des revendications 1 à 12 et un support acceptable pour son administration.



FEUILLE DE REMplacement



FEUILLE DE REMplacement



FEUILLE DE REMplacement

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/FR 92/00506
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. 5 A 61 K 9/50 A 61 K 9/51 A 61 K 9/54 A 61 K 47/42
A 61 K 47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. 5 A 61 K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP, A, 0344040 (CNRS) 29 November 1989, see the whole document (cited in the application) --	1,5-9, 11-13, 16
Y	EP, A, 0397227 (BIO-SERAЕ) 14 November 1990, see claims 1,3-8,10-16; column 5, example 1 -----	1,5-9, 11-13,16

<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input type="checkbox"/> See patent family annex.
<ul style="list-style-type: none"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 	<ul style="list-style-type: none"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 10 August 1992 (10.08.92)	Date of mailing of the international search report 9 September 1992 (09.09.92)
Name and mailing address of the ISA/ EUROPEAN PATENT OFFICE Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9200506
SA 60358

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 28/08/92.
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A- 0344040	29-11-89	FR-A-	2631826	01-12-89
		WO-A-	8911271	30-11-89
		JP-T-	4500662	06-02-92
-----	-----	-----	-----	-----
EP-A- 0397227	14-11-90	FR-A-	2646777	16-11-90
		CA-A-	2014847	12-11-90
		JP-A-	3193708	23-08-91
-----	-----	-----	-----	-----

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale : No PCT/FR 92/00506

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

Int.C1.5	A 61 K 9/50	A 61 K 9/51	A 61 K 9/54
	A 61 K 47/42	A 61 K 47/48	

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée⁸

Système de classification	Symboles de classification
Int.C1.5	A 61 K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté⁹

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS¹⁰

Catégorie ¹¹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
Y	EP, A, 0344040 (CNRS) 29 novembre 1989, voir le document en entier (cité dans la demande) ----	1, 5-9, 11-13, 16
Y	EP, A, 0397227 (BIO-SERA) 14 novembre 1990, voir revendications 1, 3-8, 10-16; colonne 5, exemple 1 -----	1, 5-9, 11-13, 16

¹⁰ Catégories spéciales de documents cités:¹¹

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant poser un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10-08-1992

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09.09.92

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

Dagmar FRANK

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9200506
SA 60358

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenues au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 28/08/92.
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0344040	29-11-89	FR-A- 2631826 WO-A- 8911271 JP-T- 4500662	01-12-89 30-11-89 06-02-92
EP-A- 0397227	14-11-90	FR-A- 2646777 CA-A- 2014847 JP-A- 3193708	16-11-90 12-11-90 23-08-91

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.